



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Food**UPV  
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos  
(FoodUPV)

Estudio de la calidad microbiológica y de las resistencias  
antimicrobianas en vegetales de producción ecológica en la  
Huerta de Valencia

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad  
Alimentaria

AUTOR/A: Díaz Millán, Elena

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a: Castillo López, María Ángeles

Cotutor/a externo: García Ferrús, Miguel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

# ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS EN VEGETALES DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA EN LA HUERTA DE VALENCIA

Elena Díaz Millán <sup>1</sup>; M<sup>a</sup> Ángeles Castillo López <sup>1,2</sup>; Ana Jiménez Belenguer <sup>1,2</sup>

## RESUMEN

El aumento de bacterias resistentes a antibióticos plantea un serio problema en Salud Pública debido a la falta de tratamientos eficaces. El consumo de productos frescos, como vegetales que a menudo no se lavan o cocinan, aumenta la presencia de estas bacterias en la cadena alimentaria humana, incrementando el riesgo de padecer infecciones difíciles de tratar. Ante la amenaza global del uso extendido de antibióticos, las organizaciones internacionales promueven la vigilancia rigurosa de bacterias resistentes en alimentos y aguas.

Se analizaron un total de 21 muestras de vegetales (acelga, col blanca, espinaca, zanahoria, patata y lechuga) y 2 muestras de tierra, todas ellas procedentes de cultivo ecológico de la ciudad de Valencia. El principal objetivo del estudio se centró en evaluar la calidad de los vegetales como reservorios de bacterias con genes de resistencia a antibióticos (ARG). Se realizó un aislamiento y recuento de bacterias viables y coliformes para obtener cepas indicadoras de *E. coli*. Además, se realizó un aislamiento selectivo para la detección de presencia o ausencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Se aislaron un total de 25 cepas de interés. Se llevaron a cabo los antibiogramas mediante la técnica de disco-placa, y se confirmó la resistencia a al menos un antibiótico en 15 de los 25 aislados. La identificación de los aislados obtuvo 12 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* y 1 cepa de *Acinetobacter baumannii*, entre otras.

La presencia de genes de resistencia a antibióticos C3G (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>), carbapenémicos (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*), mediante PCR destacaron por la detección de ARG en 13 cepas analizadas, con un total de 8 patrones de resistencia, en los que prevalecen los genes resistentes a antibióticos β-lactámicos (C3G y carbapenémicos), seguidos de antibióticos de quinolonas.

Este trabajo está relacionado con los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030: ODS 2 (Hambre cero); ODS 3 (Salud y bienestar); ODS 12 (Producción y consumo responsables) y ODS 15 (Vida de los ecosistemas terrestres).

**Palabras clave:** análisis de calidad; cultivo ecológico; vegetales; genes de resistencia; antibióticos; beta-lactámicos; carbapenémicos; quinolonas, *Stenotrophomonas maltophilia*; *Acinetobacter* spp; PCR.

<sup>1</sup>Departamento Biotecnología, <sup>2</sup> Centro Avanzado de Microbiología Aplicada. Universitat Politècnica de València

# STUDY OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCES IN ORGANICALLY PRODUCED VEGETABLES IN THE VALENCIAN ORCHARDS

Elena Díaz Millán <sup>1</sup>; M<sup>a</sup> Ángeles Castillo López <sup>1,2</sup>; Ana Jiménez Belenguer <sup>1,2</sup>

## ABSTRACT

The rise of antibiotic-resistant bacteria poses a serious public health problem due to the lack of effective treatments. The consumption of fresh produce, such as vegetables that are often not washed or cooked, increases the presence of these bacteria in the human food chain, increasing the risk of infections that are difficult to treat. In the face of the global threat of widespread antibiotic use, international organisations are promoting rigorous surveillance of resistant bacteria in food and water.

A total of 21 vegetable samples (chard, white cabbage, spinach, carrot, potato and lettuce) and 2 soil samples, all from organic farming in the city of Valencia, were analysed. The main objective of the study was to evaluate the quality of vegetables as reservoirs of bacteria with antibiotic resistance genes (ARG). Viable and coliform bacteria were isolated and counted to obtain indicator strains of *E. coli*. In addition, selective isolation was performed to detect the presence or absence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. A total of 25 strains of interest were isolated. Antibiograms were performed using the disc-plate technique, and resistance to at least one antibiotic was confirmed in 15 of the 25 isolates. Identification of the isolates yielded 12 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* and 1 strain of *Acinetobacter baumannii*, among others.

The presence of resistance genes to C3G antibiotics (*bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CMY-2), carbapenemics (*bla*IMP, *bla*OXA, *bla*VIM and *bla*KPC) and quinolones (*qnr*A, *qnr*B and *qnr*S), by PCR highlighted by the detection of ARG in 13 strains analysed, with a total of 8 resistance patterns, in which genes resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics (C3G and carbapenemics) prevail, followed by quinolone antibiotics.

This work is linked to the following Sustainable Development Goals (SDGs) of the 2030 Agenda: SDG 2 (Zero hunger); SDG 3 (Health and well-being); SDG 12 (Responsible production and consumption) and SDG 15 (Life of terrestrial ecosystems).

**Keywords:** quality análisis; organic farming; vegetables; resistance genes, antibiotics; beta-lactams; carbapenemics; quinolones; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Acinetobacter* spp; PCR.

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud global que afecta a los seres humanos, animales y a nivel ambiental. La resistencia a los antimicrobianos se desarrolla de forma natural en las bacterias, las cuales pueden ser portadoras de genes de resistencia a antibióticos (ARG) (Aslam et al., 2021). No obstante, la resistencia a múltiples fármacos ha aumentado de manera gradual desde su aparición y el uso generalizado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas, animales y vegetales (Djordjevic et al., 2024).

Las infecciones causadas por patógenos resistentes a los antimicrobianos se consideran, asimismo, una importante crisis de salud pública mundial, dado que el estudio y descubrimiento de medicamentos antimicrobianos que demuestran ser efectivos no siguen el ritmo de aparición de las altas tasas de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias (de Mesquita Souza Saraiva et al., 2022).

Por otra parte, el consumo de productos frescos ha aumentado en todo el mundo, ya que existe por parte de los consumidores un interés en mantener una dieta saludable. Al mismo tiempo, la carga microbiana de las verduras es una preocupación grave para la salud humana, ya que una gran parte de los alimentos de origen vegetal se consumen crudos o con escasos tratamientos térmicos, lo que conduce a un número creciente de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Pintor-Cora et al., 2021).

Las verduras frescas constituyen una parte esencial de una dieta saludable. Aunque el consumo de verduras crudas es muy recomendable, su uso plantea preocupaciones sobre su seguridad (Valentino et al., 2022). Constituyen un reservorio de bacterias patógenas y genes de resistencia a antibióticos (Al-Kharousi et al., 2019a), que conduce a un riesgo cada vez mayor para la salud humana.

Para abordar el problema de la resistencia antimicrobiana se apela al concepto *One Health*. Se trata de una propuesta que reconoce que la salud de las personas se encuentra altamente relacionada con la salud de los animales y el medioambiente (CDC, 2024). Dicho enfoque se centra en el papel de los ecosistemas interconectados y geográficamente cercanos, que conducen al surgimiento y difusión de la resistencia antimicrobiana (Hernando-Amado et al., 2019). Teniendo en cuenta las consecuencias que produce la resistencia antimicrobiana, el enfoque *One Health* proporciona una comprensión integral de la propagación en la triada humano-animal-medioambiente (Abia et al., 2023). En el presente trabajo nos centraremos en la resistencia a antibióticos carbapenémicos y  $\beta$ -lactámicos, de prioridad crítica por la OMS (World Health Organization, 2024). Las enterobacterias son portadoras de genes que codifican enzimas  $\beta$ -lactamasas, que constituyen un problema emergente de salud pública

mundial (Liu et al., 2022), pues son capaces de hidrolizar antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Mansaray et al., 2022). Por tanto, la propagación de bacterias gramnegativas productoras de ESBL/AmpC plantea una preocupación creciente en todo el mundo y es de importancia clínica y epidemiológica (Mansaray et al., 2022). La producción de carbapenemasas, descritas en aislamientos clínicos y ambientales de bacterias gramnegativas, es uno de los principales mecanismos de resistencia a los carbapenémicos, que constituyen un grupo de agentes antimicrobianos ampliamente considerados en diversas líneas terapéuticas, principalmente para el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos (Chelaghma et al., 2022).

El estudio propone evaluar los vegetales comercializados en Valencia como posibles reservorios de bacterias que contienen genes de resistencia a antibióticos (ARG) y su potencial para ser transmitidos a humanos. Para ello, se aislarán e identificarán enterobacterias coliformes y específicamente *Escherichia coli* mediante normas establecidas. Se procederá al recuento de microorganismos mesófilos aerobios, así como la detección e identificación de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en vegetales. También se identificarán bacterias gramnegativas resistentes a antibióticos carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación (3G) y se identificarán molecularmente las cepas obtenidas, con un enfoque particular en la detección de genes mediados por plásmidos portadores de resistencias a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y quinolonas.

Este trabajo presenta una vinculación directa con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), que promueven la realización de prácticas de desarrollo sostenibles en todo el mundo. Los ODS vinculados son ODS 2 (Hambre cero) cuyo objetivo es implantar medidas para garantizar acceso a una alimentación sana, nutritiva y eficiente y mantener sistemas de producción de alimentos sostenibles; ODS 3 (Salud y bienestar), cuya finalidad es implementar acciones de prevención de enfermedades y patologías para todos en todas las edades; ODS 12 (Producción y consumo responsables), que establece medidas de gestión sostenible y uso eficiente de recursos naturales; ODS 13 (Acción por el clima), para llevar a cabo medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos y por último, ODS 15 (Vida de ecosistemas terrestres), cuyo objetivo es gestionar sosteniblemente los bosques e invertir la degradación de las tierras y la pérdida de biodiversidad.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Muestreo: origen y preparación de muestras**

Se han analizado un total de 21 muestras de vegetales y 2 muestras de tierra, todas ellas procedentes de cultivo ecológico (Anexo A Tabla A1). El muestreo tuvo lugar durante los meses de febrero a mayo de 2024 adquiriendo las muestras de vegetales en establecimientos de la ciudad de Valencia.

Las muestras fueron procesadas según la Norma ISO 6887-1:2017: realizando una suspensión inicial en Agua de peptona tamponada (APT) (Scharlau, Barcelona, España), seguida de homogenización (BagMixer 400 P, Interscience) y diluciones decimales para examen microbiológico. Adicionalmente, se reservaron 10 mL del homogenizado para posterior extracción del ADN y análisis de genes de resistencia a antibióticos.

### **2.2. Análisis de indicadores de calidad microbiológica e higiénico-sanitaria**

Para llevar a cabo este análisis, se llevaron a cabo recuentos de microorganismos viables aerobios mesófilos y microorganismos coliformes y *E. coli*.

#### **2.2.1. Recuento de viables mesófilos aerobios**

Siguiendo la norma ISO 4833-1:2013, se llevó a cabo el análisis de microorganismos mesófilos aerobios utilizando Agar de Recuento en Placa (PCA) (Plate Count Agar, Scharlau, Barcelona, España). La lectura del recuento se llevó a cabo bajo la directiva de la Norma ISO 7218 que regula el procedimiento de los exámenes microbiológicos de alimentos para el consumo humano y animal.

#### **2.2.2. Recuento de coliformes y *E. coli***

Siguiendo la norma UNE-EN ISO 9308-1:2014, se llevó a cabo el análisis de coliformes y *E. coli* utilizando Chromogenic Coliforms Agar Base (CC) (Scharlau, Microinstant, Barcelona) como medio de cultivo. Posteriormente las colonias sospechosas de ser *E. coli* (según características del fabricante) fueron sometidas a pruebas bioquímicas para confirmar su identidad.

#### **2.2.3. Estudio de la presencia de *Salmonella* spp.**

El estudio de la presencia de *Salmonella* spp. se realizó según los protocolos recogidos en la norma UNE-EN ISO 6579-1:2017. Confirmando mediante pruebas bioquímicas.

#### **2.2.4. Estudio presencia de *Listeria monocytogenes***

Siguiendo la norma UNE-EN ISO 11290-1:2017, se llevó a cabo el análisis de la presencia de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente a las colonias sospechosas de ser *Listeria monocytogenes*., fueron sometidas a pruebas bioquímicas para confirmar su identidad.

## **2.3. Bacterias resistentes a antibióticos: aislamiento y estudio de resistencias**

### **2.3.1. Aislamiento de microorganismos resistentes a cefalosporinas de 3ª generación**

Porciones de 10 g de las muestras fueron suspendidas y homogenizadas en 90 mL de APT enriquecido con los antibióticos cefotaxima (CTX-Sigma-Aldrich, Madrid) (2,5 mg/ L) y vancomicina (VAN-Sigma-Aldrich, Madrid) (5 mg/L); este último tenía la función de inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas. Tras la incubación (37 °C, 24 h), se sembraron en placas con medio de cultivo ESBL (CHROMagar™ Orientation, CHROMagar™, Paris, Francia), un medio altamente selectivo y específico para bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas, lo que les confiere resistencia a los antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos, entre ellos cefalosporinas de 3ª generación. Se seleccionaron entre 2 y 5 colonias, según características del fabricante, para su identificación y posterior estudio de producción de resistencias a antibióticos.

### **2.3.2. Aislamiento de microorganismos resistentes a carbapenemes**

De igual manera, se tomaron 10 g de las muestras y se inocularon en 90 mL de caldo de Tripton y Soya (TSB) (Oxoid, Inglaterra) enriquecido con los antibióticos meropenem (MEM- Sigma-Aldrich, Madrid) (1 mg/L) y vancomicina (VAN) (8 mg/L) con el propósito de obtener cepas resistentes carbapenemes. Tras la incubación (37 °C, 24 h) se sembraron en placas con medio SC (CHROMagar™ mSuperCARBA™, Paris, Francia), un medio altamente selectivo y específico para bacterias con resistencia a carbapenemes. Se seleccionaron entre 2 y 5 colonias, según características del fabricante, para su identificación y posterior estudio de producción de resistencias a antibióticos.

## **2.4. Identificación de microorganismos**

Tras la obtención de cultivos puros para cada uno de los aislamientos, se procedió a la realización de diferentes pruebas bioquímicas para su identificación.

### **2.4.1. Pruebas preliminares**

- Prueba de la oxidasa: presencia del sistema citocromo oxidasa. De acuerdo con los objetivos del proyecto únicamente se seleccionaron las bacterias oxidasa negativa.
- Prueba de la catalasa: producción de catalasa. De acuerdo con los objetivos del proyecto, solamente fueron seleccionadas las bacterias catalasa positiva.
- Siembra en TSI (Triple Sugar Iron) (Scharlau, Barcelona). Se llevó a cabo en las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. con el fin de comprobar la fermentación de los azúcares presentes en el medio. Prueba identificativa para Enterobacterias.

- Tinción de Gram: Las cepas cuyos resultados en las pruebas preliminares fueron oxidasa negativo y catalasa positivo fueron sometidas a tinción, seleccionando aquellas que resultaron gramnegativas.

#### **2.4.2 Tira API 20E**

Una vez que se obtuvieron las colonias aisladas, sospechosas de pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae*, se llevó a cabo su identificación mediante tira API 20E (BioMérieux, Madrid, España), sistema rápido (24 h) y miniaturizado en el que se realizan 20 pruebas bioquímicas, Siguiendo las instrucciones del fabricante, se consultaron los resultados en la base de datos APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com/>) para obtener la identificación de las cepas aisladas.

#### **2.4.3. Tira API de Listeria**

La identificación de las cepas sospechosas de ser *Listeria* spp., se llevó a cabo mediante tiras API de Listeria (BioMérieux, Madrid, España). Consiste en llevar a cabo 10 pruebas bioquímicas miniaturizadas, con un tiempo de incubación y lectura de 24 horas., Siguiendo las instrucciones del fabricante, se consultaron los resultados en la base de datos APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com/>) para obtener la identificación de las cepas aisladas.

#### **2.4.4. Identificación molecular mediante secuenciación del gen 16SARN**

Con el fin de confirmar la identificación previa mediante tira API de todas aquellas cepas que no superaron el 90% de fiabilidad, tanto las pertenecientes a Enterobacterias como las identificadas como *Acinetobacter*, se llevó a cabo el estudio de la secuenciación del gen 16S ARNr.

Tras la comprobación de la presencia del amplicón de 1200 bp en los aislados de interés, se llevó a cabo la purificación mediante el kit “GenElute™ PCR Clean-Up Kit” (Sigma-Aldrich, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante para enviarlas al servicio de secuenciación del IBMCP en la UPV y obtener las secuencias completas. Se utilizó el programa Chromas (Technelysium, South Brisbane, Australia) para eliminar las zonas de las secuencias de menor calidad. Por último, se utilizó el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar las secuencias obtenidas con las presentes en la base de datos Genbank y poder confirmar el género y la especie de las cepas.

#### **2.4.5. Conservación de las cepas aisladas**

Las cepas aisladas e identificadas fueron resuspendidas en 1 mL de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) en tubo Eppendorf de 1,5 mL para su posterior extracción de ADN. Paralelamente, se conservaron a -20°C en



crioviales Microbank™-Red (Pro-Lab Diagnostics, Microbank™, Wirral, Reino Unido).

## **2.5. Resistencia antimicrobiana: estudio mediante antibiogramas disco-placa**

Una vez las cepas fueron aisladas e identificadas, se determinaron las resistencias antimicrobianas frente a 17 compuestos mediante el método de difusión de disco en placa en medio Müller-Hinton Agar (Scharlau, Barcelona). Dependiendo de la identificación de las cepas aisladas y sus resistencias intrínsecas, el número de antimicrobianos testados fue variable (Anexo A Tabla A2). Se realizaron suspensiones de cultivos de 24 h en suero fisiológico ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland. Las placas se sembraron mediante un bastoncillo estéril distribuyendo el inóculo uniformemente. Tras un periodo de incubación de 24 horas, se procedió a la medición de los halos de inhibición del crecimiento.

Se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922, como control de calidad de la metodología, siendo los límites aceptables de los diámetros de las zonas de inhibición los establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

## **2.6. Análisis molecular de genes de resistencia a antibióticos**

### **2.6.1. Extracción de ADN**

Para llevar a cabo la extracción del ADN de las cepas aisladas, así como de los caldos enriquecidos con antibióticos, se utilizó el kit de extracción comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Alemania), atendiendo las instrucciones del fabricante para las bacterias gramnegativas. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta el análisis molecular de genes de resistencia mediante PCR.

### **2.6.2. PCR Multiplex para la detección de genes de resistencia a antibióticos**

#### **2.6.2.1. Detección de genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos**

Para la detección de genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se llevó a cabo una PCR multiplex para los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> tanto en los aislados como en los caldos enriquecidos con antibióticos. Los cebadores, sus secuencias y tamaños de amplicones esperados se muestran en el Anexo A (Tabla A3).

Para llevar a cabo la PCR se empleó el siguiente mix de reactivos: 2,5  $\mu$ L de ADN; 1,25  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (2,5 mM); 2,5  $\mu$ L de tampón de PCR 1X; 0,2  $\mu$ L de dNTPs (0,2 mM); 0,5  $\mu$ L de cada cebador para *bla*<sub>SHV</sub>, (0,4  $\mu$ M) y 0,25  $\mu$ L para *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> (0,2  $\mu$ M); 5 U de Taq polimerasa, y agua MiliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 25  $\mu$ L. Las condiciones del termociclador fueron: 15

min a 94 °C, 30 ciclos de amplificación de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, con 10 min para la extensión final a 72 °C (Kozak et al., 2009). Se emplearon controles positivos propios y como control negativo agua MiliQ estéril.

#### **2.6.2.2. Detección de genes de resistencia a carbapenemes**

La detección de genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos, se llevó a cabo mediante dos PCR multiplex; una para los genes *bla<sub>IMP</sub>*, y *bla<sub>OXA</sub>*, y otra para los genes *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* tanto en los aislados como en los caldos enriquecidos. Los cebadores, sus secuencias y tamaños de amplicones esperados se muestran en el Anexo A (Tabla A4). Para llevar a cabo la PCR se empleó el siguiente mix de reactivos: 2,5 µL de ADN; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); 2,5 µL de tampón de PCR 1X; 0,125 µL de dNTPs (0,125 mM); 0,5 µL de cada cebador (0,2 mM); 2 U de Taq polimerasa, y agua MiliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 25 µL. Las condiciones del termociclador fueron: 10 min a 94 °C, 30 ciclos de amplificación de 30 s a 94 °C, 40 s a 52 °C y 50 s a 72 °C, con 5 min para la extensión final a 72 °C (Poirel et al. 2011) Se emplearon controles positivos propios y como control negativo agua MiliQ estéril.

#### **2.6.2.3. PCR Multiplex para la detección de genes de resistencia a quinolonas**

Para la realización de la mPCR que permite detectar genes de resistencia a quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) se empleó el siguiente mix: 2,5 µL de ADN; 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,25 mM); 2,5 µL de tampón de PCR 1X; 0,2 µL de cada dNTP (0,2 mM); 0,25 µL de cada cebador (0,25 mM); 2,5 U de Taq polimerasa, y agua MiliQ estéril hasta obtener un volumen final de la reacción del mix de 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C, 35 ciclos de amplificación de 1 min a 95 °C, 1 min a 54 19 °C y 1 min a 72 °C, con 10 min para la extensión final a 72 °C (Cattoir et al., 2009). Se emplearon controles positivos propios y como control negativo, agua MiliQ estéril. Los cebadores, sus secuencias y tamaños de amplicones esperados se muestran en el Anexo A (Tabla A5).

#### **2.6.3. Electroforesis en gel de agarosa**

Finalmente, para visualizar los productos de cada PCR de los aislados y los caldos objetivo, se llevaron a cabo las correspondientes electroforesis. Geles de agarosa al 1,5%, fueron utilizados para la detección de β-lactámicos y carbapenémicos, y geles al 1,8% para la detección de quinolonas. Posteriormente, los geles fueron visualizados bajo un transiluminador (TransilluminatorVilber, France).

#### **2.6.4. Análisis estadístico**

Para estudiar si la presencia de los genes, tanto en aislados como en los caldos, está relacionada con distintos factores (tipo de muestra, comercio, género

bacteriano), se ha llevado a cabo la prueba  $\chi^2$ , ejecutada mediante el software Statgraphics Centurion 19.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis de indicadores de calidad microbiológica e higiénico-sanitaria de las muestras

Los resultados del análisis de la calidad higiénico-sanitaria de las muestras se listan en el Anexo B Tabla B1.

Los valores de microorganismos **viabiles aerobios mesófilos** varían desde 4,60 a 8,03 unidades logarítmicas, el más bajo corresponde a la lechuga y el más alto a la espinaca. En el estudio basado en frutas y hortalizas frescas mínimamente procesadas llevado a cabo por Abadias et al. (2008), también se obtuvieron los recuentos más altos para las espinacas, brotes, zanahoria rallada y rúcula y los más bajos para la lechuga y escarola. Los recuentos más elevados se pueden atribuir a que las hojas abiertas de las espinacas podrían estar en contacto con el suelo y el agua de riego, y, por tanto, producirse la contaminación (Abadias et al., 2008). El recuento de viabiles aerobios mesófilos es indicativo de las condiciones de los productos durante su procesamiento, transporte y almacenamiento. Sin embargo, no evalúa de forma directa la seguridad de estos ya que no determina la presencia de microorganismos patógenos.

Los valores de **coliformes totales** obtenidos variaron entre 2,30 a 6,55 unidades logarítmicas correspondientes a la patata y a la col blanca, respectivamente. La diferencia entre estos valores puede deberse a que, en el caso de la col blanca, esta presenta una mayor superficie expuesta a los posibles contaminantes, en comparación con la patata, que presenta una piel protectora y se encuentra menos expuesta a la contaminación del ambiente. Las muestras de tierra mostraron valores de 4,78 (H06) a 5,51 (H23) unidades logarítmicas. La muestra H06 procede del mismo comercio que la patata (H05) para el que se obtuvo un valor de 2,30 (UFC/g  $\log_{10}$ ), y ambas muestras fueron procesadas el mismo día. Esto puede deberse al lavado de los vegetales antes de su venta, el cual pudo reducir la cantidad de coliformes totales en las muestras. Se han observado los mismos resultados para las muestras H22 y H23, patata y tierra, respectivamente, aunque de estas no tenemos la certeza de que hubiera un lavado antes de su venta, pudo deberse a que el suelo proporciona un ambiente de proliferación de los microorganismos.

En cuanto a ***E. coli***, 21 de las 23 muestras fueron negativas para la presencia de *E. coli*, lo cual señala una buena calidad higiénico-sanitaria, según Reglamento (CE) 2073/2005 por el que se establece el límite higiénico aceptable en 1000 UFC/g en hortalizas no pasteurizadas, listas para el consumo directo. Por el contrario 2 muestras, H12 y H20 (acelga y zanahoria, respectivamente) dieron

positivo para la presencia de *E. coli*, superando el valor establecido, por lo que se requieren mejoras en la higiene de la producción.

A partir de dichas muestras y siguiendo el protocolo descrito en material y métodos se aislaron 4 cepas identificadas como presuntas *E. coli* para posterior estudio de resistencias a antibióticos.

**Análisis de *Salmonella* spp.** La detección de *Salmonella* spp., se realizó sobre las 23 muestras tal y como exige el Reglamento (CE) 2073/2005, la presencia de *Salmonella* spp. en 25 g debe ser nula. Los resultados indicaron ausencia de *Salmonella* spp. para todas las muestras implicadas en el estudio. Sin embargo, tras realizar la prueba bioquímica de TSI, algunos aislados de las muestras mostraban características sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*. Estas cepas fueron sometidas a identificación mediante tira API y todas aquellas que resultaron ser del grupo de las enterobacterias fueron aisladas para posterior estudio de resistencias a antibióticos.

**Análisis de *Listeria monocytogenes*.** La detección de *Listeria monocytogenes* se realizó sobre las 23 muestras. Solamente 3 de ellas (H01, H02 y H04) resultaron positivas para la presencia de 4 cepas sospechosas, las cuales fueron sometidas a identificación mediante tira API Listeria: 2 fueron identificadas como *L. ivanovii*, y las otras dos como *L. grayi* y *L. seeligeri*. Dicho aislamiento estaba dirigido únicamente a cepas de *L. monocytogenes*, por tanto, no fue considerada de gran relevancia la identificación de estas cepas. El Reglamento (CE) 2073/2005 indica ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g en las muestras para su consumo. Se trata de una medida que establece un umbral para la protección de la salud pública para minimizar la capacidad de la bacteria para provocar enfermedades graves, como listeriosis y, por tanto, interferir en la salud de los consumidores, especialmente en los grupos vulnerables.

Estos resultados sugieren la necesidad de un lavado de los vegetales previo a su consumo, especialmente en la temporada de verano, al representar un riesgo de salud pública tras la elevada posibilidad de consumirse sin cocción y desarrollar infecciones bacterianas. Asimismo, existen estudios que corroboran el lavado de los vegetales para su consumo en fresco con agua que contiene hipoclorito de sodio, a una concentración de 20 mg/L (Pezzuto et al., 2016).

### **3.2. Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos**

A partir de la siembra de las muestras en medios selectivos con antibióticos (ESBL y SC), se aislaron un total de 122 cepas, de las cuales 14 dieron resultado negativo para la prueba de la oxidasa, positivo en la prueba de la catalasa y gramnegativas. Los 108 aislados restantes dieron positivo para la prueba de la oxidasa siendo descartados para el análisis al no formar parte del grupo crítico en la lista actualizada de bacterias patógenas prioritarias (BPPL) por

la World Health Organization (WHO). Actualmente, la OMS continúa destacando bacterias gramnegativas como patógenos críticos, entre las cuales destacan las enterobacterias resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación y las cepas *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos (World Health Organization, 2024). De estas 14 cepas, 7 fueron aisladas de medio ESBL mostrando posible resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos mientras que las 7 cepas restantes fueron aisladas de medio SC indicando posible resistencia a antibióticos carbapenémicos.

También se realizó la prueba ESBL en las cepas aisladas. Se trata de un método cuya finalidad es determinar si la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se debe al mecanismo de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro. Los antibióticos participantes de la prueba fueron cefotaxima, ceftazidima y cefepima junto con la versión de cada uno de ellos mezclado con ácido clavulánico. Se compararon los halos de crecimiento de las cepas y aquellas en las que la versión con ácido clavulánico fue superior a 5 milímetros que su homólogo sin clavulánico, fueron consideradas prueba ESBL positiva (CLSI, 2020).

### **3.3. Identificación de las cepas obtenidas en el estudio**

Todas las cepas aisladas a lo largo del trabajo han sido sometidas a la identificación mediante tira API 20E. Por un lado, las presuntas *E. coli*, aisladas del medio CC, las aisladas del análisis de *Salmonella* (medio TSI) y las aisladas de las pruebas de medios con antibióticos (ESBL y SC). Además, todas aquellas cuya identificación fue dudosa, así como la cepa presuntamente identificada como *Acinetobacter baumannii*, fueron sometidas a identificación mediante secuenciación del gen 16S ARNr. La Tabla B2 (Anexo B) muestra la identificación de las cepas.

En el estudio se han identificado un total de 12 cepas de *S. maltophilia*, siendo esta la especie mayormente encontrada. Además, se han identificado 4 cepas de *E. coli*, 2 cepas de *C. amalonaticus*, 2 cepas de *P. rettgeri*, 1 cepa de *E. cloacae*, 1 cepa de *E. hormaechei*, 1 cepa de *A. baumannii*, 1 cepa de *C. koseri* y 1 cepa de *Pantoea* spp.

*S. maltophilia* ha sido la especie predominantemente aislada en las muestras analizadas, detectándose en todos los tipos de muestra excepto en patata. Se trata de un patógeno emergente oportunista que suele encontrarse en ambientes acuáticos y que OMS ha clasificado como uno de los principales organismos resistentes a múltiples fármacos (MDRO) (Chang et al., 2015). A pesar de tener una baja virulencia, es responsable de causar infecciones nosocomiales en entornos hospitalarios, por tanto, la presencia y gran frecuencia de la especie bacteriana en vegetales puede resultar de gravedad para la población (Brooke, 2021). *S. maltophilia* también está caracterizada por presentar una gran cantidad de genes de resistencia a los antimicrobianos y mutaciones

genéticas, lo cual, supone un peligro para la dispersión de dichas resistencias (Tamma et al., 2022).

*A. baumannii* también ha sido identificada en las muestras analizadas. Se trata de un patógeno nosocomial crítico capaz adquirir nuevos genes de resistencia a antibióticos, y, además, recientemente ha aumentado su tasa de resistencia a los agentes antibacterianos de uso habitual (Zhang et al., 2024). Las especies de *Acinetobacter* tienen tendencia a desarrollar una resistencia generalizada a los principales grupos de antibióticos y tienen la capacidad de persistir en el medio ambiente durante largos periodos. Por tanto, los alimentos contaminados por *Acinetobacter* contribuyen a la propagación horizontal de genes de resistencia a otros patógenos (Carvalho et al., 2017).

Ambas bacterias presentan una gran relevancia clínica ya que están relacionadas con enfermedades nosocomiales. Además, son consideradas bacterias oportunistas que provocan infecciones en personas inmunodeprimidas, agravando así su pronóstico (Rico & Falomir, 2020).

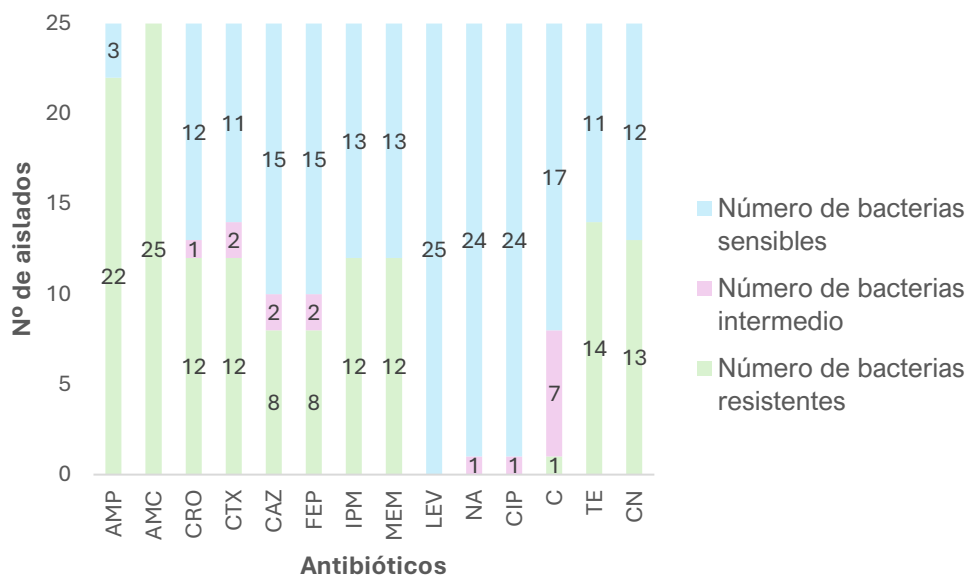
Cabe destacar que en estudios como los de Jiménez-Belenguer et al. (2023) y Karumathil et al. (2016) han destacado la presencia de dichos patógenos oportunistas, que portan resistencias antibióticas en vegetales, y generan un impacto sobre la expansión de resistencias antibióticas en la comunidad de gran relevancia.

### **3.4. Análisis de resistencias fenotípicas de las cepas aisladas: antibiogramas**

Los resultados de los antibiogramas se muestran en la Figura 1. De los 25 aislados obtenidos, 15 de ellos mostraron resistencia a al menos un antibiótico. La mayor resistencia se detectó frente a AMC (100% de las cepas), seguida de AMP (88%). Porcentajes intermedios se detectaron para TE (56%), CN (52%), CTX, CRO, IPM, MEM, CN (48%) y para CAZ y FEP (32%). La alta resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, sobre todo correspondiente a las penicilinas, también fue observada en el estudio de las cepas gramnegativas aisladas de brotes de lechuga, espinacas y alfalfa por Bezanson et al. (2008). Además, Al-Hharousi et al. también en un estudio anterior sobre *Enterobacteriaceae* aisladas de vegetales y frutos secos observaron la predominancia de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, y en concreto, a las penicilinas (Al-Kharousi et al., 2019).

En el estudio del aislamiento de enterobacterias en vegetales frescos por Osterblad et al., se detectaron tasas bajas de resistencia a la tetraciclina y tasas intermedias de resistencia al C. La resistencia al C y a la TE generalmente está relacionada con la resistencia a las sulfonamidas, y en ocasiones, se transfieren por conjugación desde las enterobacterias fecales (Osterblad et al., 1999). Este

hecho sugiere el posible origen de la presencia de resistencia para el antibiótico TE en los resultados obtenidos.



**FIGURA 1.** Distribución de resistencias fenotípicas de los aislados para cada antibiótico ensayado (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; IPM: imipenem; MEM: meropenem; LEV: levofloxacino; NA: ácido nalidixico; CIP: ciprofloxacino; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina; CN: gentamicina)

En cuanto a los antibióticos de la familia de las quinolonas, se observa que ninguna cepa mostró resistencia frente a LEV, NA y CIP. Esta gran sensibilidad a las quinolonas también fue observada por Zurfluh et al. (2015) en el estudio de vegetales frescos importados a Suiza donde se buscaba la presencia de *Enterobacteriaceae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

En la Tabla 1 se muestran los diferentes perfiles de resistencia detectados en las cepas. Se han obtenido 9 perfiles de resistencia que varían entre la resistencia a un único antibiótico (AMP) hasta diez. Un perfil mostró resistencia a 2 antibióticos, 2 perfiles a 3 antibióticos, 1 perfil frente a 4 antibióticos, y 4 perfiles mostraron resistencia a 8 o más antibióticos.

Cuando las bacterias presentan resistencia a tres o más clases o subclases de agentes antimicrobianos se las considera multirresistentes (Magiorakos et al., 2012). En este sentido, destaca la presencia de perfiles de mutirresistencia, considerando ésta como la resistencia a 3 o más clases de antibióticos (Magiorakos et al., 2012). Más de la mitad de los perfiles (5) muestran multirresistencia, los cuales corresponden a 13 cepas (52%), siendo la especie predominante *S. maltophilia* con resistencias a 5 o más clases de antibióticos. Se trata de una bacteria ambiental y patógena emergente, que produce enfermedades pulmonares y del torrente sanguíneo y que afecta gravemente a la población vulnerable (Jiménez-Belenguer et al., 2023).

**TABLA 1.** Perfiles de resistencia de las cepas.

Patrones de resistencia	Nº de cepas	Identificación
AMC	3	<i>E. coli</i> (2) <i>Pantoea</i> sp. (1)
AMP-AMC	7	<i>C. koseri</i> (3) <i>E. cloacae</i> (2) <i>E. coli</i> (2)
AMP-AMC   C	1	<i>A. baumannii</i>
AMP-AMC   TE	1	<i>P. rettgeri</i>
AMP-AMC   CN   TE	1	<i>P. rettgeri</i>
AMP-AMC   CTX-CRO   IPM-MEM   CN   TE	1	<i>S. maltophilia</i>
AMP-AMC   CTX-CRO-CAZ   IPM-MEM   CN   TE	3	<i>S. maltophilia</i>
AMP-AMC   CTX-CRO-FEP   IPM-MEM   CN   TE	3	<i>S. maltophilia</i>
AMP-AMC   CTX-CRO-CAZ-FEP   IPM-MEM   CN   TE	5	<i>S. maltophilia</i>

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; IPM: imipenem; MEM: meropenem; LEV: levofloxacin; NA: ácido nalidixico; CIP: ciprofloxacino; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina; CN: gentamicina

En cuanto a la prueba ESBL, se analizaron 23 cepas bacterianas aisladas, de las cuales el 52,17% (12/23) resultaron positivas ESBL (Anexo B, Tabla B3). Previo a realizar con los antibiogramas, se realizó la identificación de las cepas mediante el uso de tiras API, lo que permitió conocer su perfil bioquímico y establecer su identidad con un nivel de confianza adecuado. Para aquellas cepas cuya identidad fue *S. maltophilia*, están caracterizadas sus resistencias intrínsecas, lo cual llevó a que ciertos antibióticos no fueran evaluados en estas cepas. De las 12 cepas que resultaron ser positivas en la prueba ESBL, el 16,66% (2/12) procedían de muestras de acelga, el 8,33% (1/12) de muestras de Col Blanca y el 25% (3/12) de muestras de tierra. Estas cepas presentaban resistencia frente al antibiótico sin ácido clavulánico, sin embargo, dicha resistencia fue contrarrestada al combinar el antibiótico con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, como es el caso del ácido clavulánico. Estos resultados evidencian la importancia del uso de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas para incrementar la efectividad de antibióticos frente a cepas resistentes.

### 3.5. Detección molecular de genes de resistencia a antimicrobianos en las cepas aisladas

En el Anexo B (Tabla B4) se muestran los resultados totales de la detección de genes de resistencia en las 25 cepas aisladas. En el 52% de las cepas (13) se ha detectado al menos un tipo de gen de resistencia. El gen de mayor presencia fue *qnrB* en el 20% de las cepas, seguido de *qnrA* y *bla<sub>OXA</sub>*, ambos en el 16% de las cepas. La prevalencia del gen *qnrB* sobre el gen *qnrA* también se observó en el estudio llevado a cabo por Jeong et al. 2011). En el estudio con muestras similares dirigido por Taha et al. (2019), los autores afirmaron que la presencia de los genes de quinolonas en las cepas aumenta la resistencia a NA y a las



fluoroquinolonas de cuatro a ocho veces (Taha et al., 2019), mientras que en nuestro estudio no se detecta esta correlación.

Con el fin de establecer si existe entre la presencia/ausencia de genes de resistencia en las cepas analizadas con el tipo de muestra, el comercio de procedencia y la especie bacteriana, se realizó la prueba  $\chi^2$ . Los resultados se muestran en el Anexo B (Tabla B5).

Según el tipo de muestra, destaca que en las cepas aisladas de col y tierra no se detectó ninguno de los genes estudiados. Dado que todas las coles analizadas en este estudio proceden del comercio A, del que se tiene constancia que lavaron los vegetales, es probable que la presencia de bacterias y por tanto de ARGs en estas muestras haya disminuido. Con respecto a los resultados negativos en las muestras de tierra, Li et al., (2022) afirmaron que, en función del tipo de fertilizante orgánico aplicado, aumenta la abundancia de los ARG en el suelo y, por tanto, la presencia de los vegetales cultivados. Además del tipo de fertilizante, también podría influir las características del suelo específicas y vegetales. Los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> únicamente fueron detectados en vegetales de hoja verde, mientras que *qnrS* lo fue en zanahorias. El resto de los genes a excepción de *bla*<sub>KPC</sub>, fueron detectados en ambos tipos de muestras, siendo significativa la presencia de los genes *bla*<sub>CMY-2</sub> y *qnrS* cuya presencia fue significativamente mayor en tubérculos (zanahorias) y menor en los vegetales de hoja verde ( $\chi^2 = 9,774$ ,  $p=0,0444$  y  $\chi^2 = 15,942$ ,  $p=0,0031$ , respectivamente).

Con respecto al comercio, la presencia de ARGs fue mayoritaria en los comercios A y B. Los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y *qnrA* se detectaron en cepas procedentes de los comercios A y B. El resto de los genes se detectaron únicamente en las muestras procedentes del comercio A, a excepción del gen *qnrB* que también fue detectado en el comercio C. El estudio estadístico no mostró relación significativa entre ambos factores ( $p>0.05$ ) para ninguno de los genes estudiados.

Por último, con respecto al género bacteriano, el análisis estadístico demostró una relación significativa entre la presencia de genes y el género de la cepa. Destaca el gen *bla*<sub>SHV</sub> que únicamente fue detectado en *A. baumannii* ( $\chi^2 = 25,000$ ,  $p=0,0003$ ); el gen *bla*<sub>OXA</sub> ( $\chi^2 = 25,000$ ,  $p=0,0003$ ) detectado mayoritariamente en cepas del género *Citrobacter* y el gen *qnrB* ( $\chi^2 = 21,875$ ,  $p=0,0013$ ) en *E. coli*.

En 3 cepas (una de *E. cloacae* y 2 de *E. coli*) se detectaron un máximo de 4 genes de resistencia; para el resto de las cepas positivas se detectaron entre 1 y 2 genes.

Adicionalmente, tras obtener los datos de los genes de resistencia, se analizaron los perfiles específicos de los patrones de resistencia, presentes en la Tabla 2.

**TABLA 2.** Patrones de resistencias de los aislados.

Patrón de resistencia	Nº de cepas	Identificación
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	3	<i>C. amalonaticus</i> , <i>Pantoea</i> sp, <i>C. koseri</i>
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1	<i>S. maltophilia</i>
<i>qnrA</i>	2	<i>E. hormaechei</i> , <i>P. rettgeri</i>
<i>qnrB</i>	2	<i>E. coli</i> (2)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	1	<i>C. amalonaticus</i>
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	1	<i>A. baumannii</i>
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	2	<i>E. coli</i> (2)
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>qnrB</i>	1	<i>E. cloacae</i>

Se han obtenido 8 patrones de resistencia, de los cuales el 50% (4) son a un único gen, el 25% (2) a dos genes y otro 25% (2) a cuatro genes. Los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas son los que se encuentran en mayor proporción en los patrones de resistencia, seguidos de los genes que codifican para quinolonas. *E. cloacae* (H03-2) fue la única cepa multirresistente, en la cual se detectaron genes correspondientes a las 3 clases de antibióticos utilizados. En 2 cepas de *E. coli* (H20-1 y H20-2) se detectaron los tres genes de resistencia para quinolonas. Además, resaltar, que la única cepa aislada e identificada como *A. baumannii*, es portadora de 2 ARGs, uno frente a C3G (*bla*<sub>SHV</sub>) y otro frente a carbapenemes (*bla*<sub>KPC</sub>). Este hecho corrobora la necesidad de una vigilancia epidemiológica de estas bacterias por ser patógenos oportunistas.

El hecho de que se haya detectado mayor tasa de resistencia en la prueba fenotípica (antibiogramas), indica que las cepas aisladas podrían tener otros genes de resistencia diferentes a los estudiados en el presente trabajo.

### 3.6. Detección molecular de genes de resistencia a antimicrobianos en los caldos

Adicionalmente también se llevó a cabo la detección de los ARGs a partir del ADN extraído de los caldos de APT, correspondientes a cada una de las muestras (Anexo B Tabla B6).

En 16 de las muestras (69,56%) se detectó al menos uno de los genes. Siendo los genes *bla*<sub>CMY-2</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> los más frecuentes (32%), siguiéndole en frecuencia el gen *qnrB* en el 16% de las muestras. Por el contrario, los genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> y la quinolona *qnrS* no fueron detectados en ninguna de las muestras.

El análisis estadístico de los resultados (Anexo B Tabla 7) no mostró ningún tipo de relación significativa entre la presencia de los genes con el comercio en el que se adquirieron las muestras. Por el contrario, sí se encontró una relación

significativa para el gen *qnrB* ( $\chi^2 = 10,582$ ,  $p=0,0142$ ) con el tipo de muestras, cuya presencia fue mayoritaria en muestras de col, no detectándose en la mayoría de las muestras de hoja verde.

Al comparar la presencia de genes de resistencia a antibióticos entre cepas y caldos, se observa que, en general, la presencia de genes es mayor en las cepas que en los caldos. Para las C3G, el gen detectado con mayor prevalencia ha sido *bla<sub>CMY-2</sub>* tanto a nivel de cepas como en caldos, mientras que, a nivel de cepa, el gen detectado con menor prevalencia ha sido *bla<sub>SHV</sub>*, no habiendo sido detectado en caldos. En el caso de detección de carbapenémicos, el gen *bla<sub>OXA</sub>* ha sido mayoritariamente detectado a nivel de cepa y caldos mientras que, el gen *bla<sub>VIM</sub>* ha sido detectado en caldos, pero no en cepas y el gen *bla<sub>IPM</sub>* ha sido detectado en cepas, pero no en caldos. Aunque hay una clara variabilidad en la presencia de los genes detectados, que puede ser debida a múltiples factores (tamaño muestral, tipo de muestra...), la presencia de los mismos indica la necesidad de su monitorización para conocer la dispersión de ARGs en el ambiente.

Con respecto a genes de quinolonas, el gen más representado ha sido la quinolona *qnrB*, mientras que la quinolona *qnrS* ha sido detectada a nivel de cepa pero no en caldos.

Cabe destacar que se han encontrado genes de resistencia a antibióticos en 7 caldos en los cuales no se lograron aislar cepas. Este hallazgo evidencia que existen otras bacterias presentes en los vegetales, que no fueron seleccionadas específicamente en nuestro estudio, sin embargo, también presentan genes de resistencia antibiótica y por ello, pueden representar reservorios de genes de resistencia a antibióticos, con la posibilidad de propagarse globalmente (Serwecińska, 2020).

#### **4. CONCLUSIONES**

El estudio planteado con referencia a las condiciones higiénico-sanitarias de los vegetales de origen ecológico ha mostrado en general unos valores adecuados. No obstante, en una muestra de acelga y otra de zanahoria se detectó la presencia de *E. coli* superando el valor establecido, lo que sugiere la necesidad de una mejora en la higiene de la producción.

Se han logrado aislar un total de 25 cepas pertenecientes a 10 especies diferentes, 2 cepas del total pertenecen a *E. coli* aisladas como organismo indicador. No se ha detectado *Salmonella* spp. ni *L. monocytogenes* en ninguna muestra, lo que indica, que las cepas analizadas cumplen con los estándares de seguridad microbiológica y no presentan un riesgo significativo de contaminación por estos patógenos.

Los métodos de identificación de las cepas aisladas, tira API y secuenciación del gen 16S ARNr, han resultado proporcionar resultados similares en la identificación. Se recomienda la utilización de esta técnica molecular, ya que es mucho más precisa la secuenciación del gen 16S ARNr para identificar específicamente la especie.

Los géneros identificados han sido *Stenotrophomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pantoea* y *Providencia* siendo *S. maltophilia* la especie predominante en las muestras analizadas. La identificación de bacterias oportunistas como *S. maltophilia* y *Acinetobacter* spp. es de gran relevancia, puesto que ambas presentan resistencias intrínsecas y adquiridas a gran cantidad de antibióticos. Por lo tanto, el consumo de los vegetales en crudo sin un lavado adecuado puede representar un mayor riesgo para personas con sistemas inmunológicos debilitados, empeorando la situación clínica de pacientes con enfermedades nosocomiales.

Se ha conseguido aislar e identificar un total de 23 cepas gramnegativas resistentes mayoritariamente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos testados, concretamente a las cefalosporinas de tercera generación y solo dos cepas con resistencia intermedia a quinolonas. La resistencia predominante a los antibióticos 3GC y carbapenémicos es un hecho preocupante, ya que estos son utilizados en tratamientos clínicos.

Finalmente, se han conseguido detectar genes de resistencia en 13 cepas analizadas a partir de los diferentes aislamientos, con un total de 8 patrones de resistencia, los genes que prevalecen en la mayoría de los casos a nivel de cepas y a nivel de caldos son aquellos resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (C3G y carbapenémicos), seguidos de antibióticos de quinolonas. Por tanto, la variabilidad observada en los ARG detectados destaca la importancia de una vigilancia continua para controlar la dispersión de los ARGs en el entorno.

Se ha detectado una cepa (*E. cloacae*) multirresistente. La identificación de bacterias multirresistentes destaca la necesidad de implantar medidas para controlar la propagación de estas resistencias y limitar su expansión. Por tanto, sería útil investigar más genes que estén vinculados a la resistencia a estos antibióticos con el fin de generar una visión más completa los genes de resistencia presentes.

Los resultados obtenidos constituyen una fuente de información relevante en el contexto de *One Health* y la lucha contra las resistencias antimicrobianas, así como su impacto global en el medio ambiente, que apela a la necesidad de un realizar una vigilancia epidemiológica continua de las resistencias antibióticas en bacterias presentes en los alimentos para frenar la propagación de las mismas y, hacer frente a este problema acuciante de Salud Pública.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
- Abia, A. L. K., Traore, A. N., & Potgieter, N. (2023). Editorial: Antimicrobial resistance and one health: from culture to genomics. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1294241>
- Al-Kharousi, Z. S., Guizani, N., Al-Sadi, A. M., & Al-Bulushi, I. M. (2019a). Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from fresh fruits and vegetables and characterization of their AmpC  $\beta$ -lactamases. *Journal of Food Protection*, 82(11), 1857–1863. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-089>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- BEZANSON, G., MACINNIS, R., POTTER, G., & HUGHES, T. (2008). Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.008>
- Brooke, J. S. (2021). Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 34, Issue 3). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-19>
- Carvalho, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2017). Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp. *Food Microbiology*, 64, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.005>
- Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue SEP). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00893>
- Chelaghma, W., Loucif, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., & Rolain, J. M. (2022). Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria. *Antibiotics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080988>
- de Mesquita Souza Saraiva, M., Lim, K., do Monte, D. F. M., Givisiez, P. E. N., Alves, L. B. R., de Freitas Neto, O. C., Kariuki, S., Júnior, A. B., de Oliveira, C. J. B., & Gebreyes, W. A. (2022). Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 53, Issue 1, pp. 465–486). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00635-8>
- Djordjevic, S. P., Jarocki, V. M., Seemann, T., Cummins, M. L., Watt, A. E., Drigo, B., Wyrsh, E. R., Reid, C. J., Donner, E., & Howden, B. P. (2024). Genomic surveillance for antimicrobial resistance — a One Health perspective. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 25, Issue 2, pp. 142–157). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00649-y>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. In *Nature Microbiology* (Vol. 4, Issue 9, pp. 1432–1442). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>

- Jeong, H. S., Bae, I. K., Shin, J. H., Jung, H. J., Kim, S. H., Lee, J. Y., Oh, S. H., Kim, H. R., Chang, C. L., Kho, W.-G., & Lee, J. N. (2011). Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in Enterobacteriaceae. *Annals of Laboratory Medicine*, 31(4), 257–264. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.257>
- Jiménez-Belenguer, A. I., Ferrús, M. A., Hernández, M., García-Hernández, J., Moreno, Y., & Castillo, M. Á. (2023). Prevalence and Characterization of Beta-Lactam and Carbapenem-Resistant Bacteria Isolated from Organic Fresh Produce Retailed in Eastern Spain. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>
- Karumathil, D. P., Yin, H.-B., Kollanoor-Johny, A., & Venkitanarayanan, K. (2016). Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria on Fresh Vegetables Collected from Farmers' Markets in Connecticut. *Journal of Food Protection*, 79(8), 1446–1451. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-548>
- Li, H., Zheng, X., Tan, L., Shao, Z., Cao, H., & Xu, Y. (2022). The vertical migration of antibiotic-resistant genes and pathogens in soil and vegetables after the application of different fertilizers. *Environmental Research*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111884>
- Liu, J., Lin, X., Soteyome, T., Ye, Y., Chen, D., Yang, L., & Xu, Z. (2022). A strategy design based on antibiotic-resistance and plasmid replicons genes of clinical *Escherichia coli* strains. *Bioengineered*, 13(3), 7500–7514. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2047543>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mansaray, A. H. D., Yankson, D. P. Y., Johnson, R. A. B., Moses, F. L., Kanu, J. S., Kamara, I. F., Zachariah, R., Kumar, A. M. V., & Selvaraj, K. (2022). Bacterial Isolates and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Fresh Poultry Excreta Used for Vegetable Farming in Freetown, Sierra Leone. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph19095405>
- Osterblad, M., Pensala, O., Peterzens, M., Helenius, H., & Huovinen, P. (1999). Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(4), 503–509. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.503>
- Pezzuto, A., Belluco, S., Losasso, C., Patuzzi, I., Bordin, P., Piovesana, A., Comin, D., Mioni, R., & Ricci, A. (2016). Effectiveness of washing procedures in reducing *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on a raw leafy green vegetable (*Eruca vesicaria*). *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01663>
- Pintor-Cora, A., Álvaro-Llorente, L., Otero, A., Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Allende, A., & Burgess, C. (2021). *Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Fresh Produce*. <https://doi.org/10.3390/foods>
- Rico, H., & Falomir, P. (2020). Comparison of the antibiotic-resistant enterobacteriaceae content in conventional, organic and fresh-cut vegetables sold in Valencia (Spain). *AIMS Agriculture and Food*, 5(2), 233–244. <https://doi.org/10.3934/AGRFOOD.2020.2.233>
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: A risk to the environment and to public health. *Water (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/w12123313>
- Taha, S. A., Omar, H. H., & Hassan, wafaa H. (2019). Characterization of plasmid-mediated qnrA and qnrB genes among Enterobacteriaceae strains: quinolone resistance and ESBL production in Ismailia,

Egypt. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 20(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0026-1>

- Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., Van Duin, D., & Clancy, C. J. (2022). Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacterales, Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* Infections. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 74, Issue 12, pp. 2089–2114). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1013>
- Valentino, V., Sequino, G., Cobo-Díaz, J. F., Álvarez-Ordóñez, A., De Filippis, F., & Ercolini, D. (2022). Evidence of virulence and antibiotic resistance genes from the microbiome mapping in minimally processed vegetables producing facilities. *Food Research International*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112202>
- Zhang, S., Di, L., Qi, Y., Qian, X., & Wang, S. (2024). Treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1395260>
- Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinnen, M., Morach, M., Berner, A. Z., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3115–3120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00258-15>

**ANEXO A**

**TABLA A1.** Muestras analizadas.

<b>Vegetal</b>	<b>Códigos</b>	<b>Toma de muestra</b>	<b>Comercio</b>
<b>Acelga</b>	H01	Febrero, 2024	A
	H08	Marzo, 2024	B
	H12	Abril, 2024	C
<b>Col Blanca</b>	H02	Febrero, 2024	A
	H21	Mayo, 2024	A
<b>Espinaca</b>	H03	Febrero, 2024	A
	H07	Marzo, 2024	B
	H10	Marzo, 2024	D
	H15	Mayo, 2024	B
	H04	Febrero, 2024	A
<b>Zanahoria</b>	H13	Abril, 2024	C
	H18		B
	H20	Mayo, 2024	A
<b>Patata</b>	H05	Febrero, 2024	A
	H14	Abril, 2024	C
	H17	Mayo, 2024	B
	H22		A
<b>Lechuga</b>	H09	Marzo, 2024	D
	H11	Abril, 2024	C
	H16		B
	H19	Mayo, 2024	A
<b>Tierra</b>	H06	Febrero, 2024	A
	H23	Mayo, 2024	A



**TABLA A2.** Antibióticos utilizados para el estudio según la clase y subclase a la que pertenecen, abreviatura y concentración ( $\mu\text{g}$ ) (CLSI, 2020).

<b>Clase</b>	<b>Subclase</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b>
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Penicilinas	AMP	Ampicilina	10
		AMC	Amoxicilina	3
		CRO	Ceftriaxona	30
	Cefalosporinas	CTX	Cefotaxima	30
		CTL	Cefotaxima +Ac. Clavulánico	30 + 10
		CAZ	Ceftazidima	30
		CAL	Ceftazidima+Ac. Clavulánico	30 + 10
		FEP	Cefepima	30
		FEL	Cefepima +Ac. Clavulánico	30 + 10
		Carbapenemes	IPM	Imipenem
	MEM		Meropenem	10
	<b>Quinolonas</b>	LEV	Levofloxacino	5
		NA	Ácido nalidíxico	30
CIP		Ciprofloxacino	5	
<b>Anfenicoles</b>	C	Cloranfenicol	30	
<b>Tetraciclinas</b>	TE	Tetraciclina	30	
<b>Aminoglucósidos</b>	CN	Gentamicina	10	

**TABLA A3.** Cebadores empleados para la detección de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Kozak et al., 2009).

<b>Gen</b>	<b>Amplicón (pb)</b>	<b>Secuencias</b>
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	247	F 5'-TTAACTGGCGAACTACTTAC-3' R 5'-GTCTATTTTCGTTTCATCCATA-3'
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	393	F 5'-AGGATTGACTGCCTTTTTTG-3' R' 5'-ATTTGCTGATTTTCGCTCG-3'
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	1000	F 5'-GACAGCCTCTTTCTCCACA-3' F 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'

**TABLA A4.** Primers empleados para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos (Poirel et al., 2011).

<b>Gen</b>	<b>Amplicón (pb)</b>	<b>Secuencias</b>
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	232	F 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' R 5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3'
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	438	F 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3' R 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	798	F 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' R 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	390	F 5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3' R 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'

**TABLA A5.** Primers empleados para la detección de genes de resistencia a quinolonas (Cattoir et al., 2007).

<b>Gen</b>	<b>Amplicón (pb)</b>	<b>Secuencias</b>
<i>qnrA</i>	580	F 5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3' F 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3'
<i>qnrB</i>	264	F 5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' F 5'-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-3'
<i>qnrS</i>	428	F 5'-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3' F 5'-TCTAAACCGTCGAGTTCGGG-3'

## ANEXO B

**TABLA B1.** Calidad higiénico-sanitaria de las muestras (UFC/g  $\log_{10}$ ).

<b>Muestras</b>	<b>Vegetal</b>	<b>Viables UFC/g <math>\log_{10}</math></b>	<b>Coliformes UFC/g <math>\log_{10}</math></b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g <math>\log_{10}</math></b>
<b>H01</b>	Acelga	8,03	5,40	-**
<b>H02</b>	Col Blanca	6,40	5,81	-
<b>H03</b>	Espinaca	8,03	4,89	-
<b>H04</b>	Zanahoria	7,30	6,28	-
<b>H05</b>	Patata	6,20	2,30	-
<b>H06</b>	Tierra	7,35	4,78	-
<b>H07</b>	Espinaca	6,50	4,13	-
<b>H08</b>	Acelga	7,22	5,90	-
<b>H09</b>	Lechuga	6,20	6,35	-
<b>H10</b>	Espinaca	7,63	6,21	-
<b>H11</b>	Lechuga	6,43	5,99	-
<b>H12</b>	Acelga	7,33	6,10	3,32
<b>H13</b>	Zanahoria	5,63	5,71	-
<b>H14</b>	Patata	6,08	3,92	-
<b>H15</b>	Espinaca	6,53	6,40	-
<b>H16</b>	Lechuga	6,70	6,42	-
<b>H17</b>	Patata	5,08	3,18	-
<b>H18</b>	Zanahoria	5,60	4,33	-
<b>H19</b>	Lechuga	4,60	5,74	-
<b>H20</b>	Zanahoria	*	4,95	3,11
<b>H21</b>	Col Blanca	7,00	6,55	-
<b>H22</b>	Patata	5,08	5,09	-
<b>H23</b>	Tierra	6,89	5,51	-

\*: error experimental; \*\*: no detectado

**TABLA B2.** Identificación de los aislados y procedencia.

<b>Aislamiento</b>	<b>Código cepa</b>	<b>Vegetal</b>	<b>API</b>	<b>Secuenciación 16S ARNr</b>
<b>CC</b>	H12-1	Acelga	<i>E. coli</i>	
	H12-2	Acelga	<i>E. coli</i>	
	H20-1	Zanahoria	<i>E. coli</i>	
	H20-2	Zanahoria	<i>E. coli</i>	
<b>TSI</b>	H01-2	Acelga	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>C. amalonaticus</i>
	H03-1	Espinaca	<i>C. koseri</i>	<i>C. amalonaticus</i>
	H03-2	Espinaca	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
	H07-2	Espinaca	<i>E. cloacae</i>	<i>E. hormaechei</i>
	H11-1	Lechuga	<i>Providencia rettgeri</i>	
	H15-1	Espinaca	<i>C. koseri</i>	
	H16-1	Lechuga	<i>P. rettgeri</i>	
<b>ESBL</b>	H01-3	Acelga	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	H02-1	Col Blanca	<i>S. maltophilia</i>	
	H04-1	Zanahoria	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>
	H06-2	Tierra	<i>S. maltophilia</i>	
	H08-1	Acelga	<i>S. maltophilia</i>	
	H09-1	Lechuga	<i>S. maltophilia</i>	
	H18-1	Zanahoria	<i>S. maltophilia</i>	
<b>SC</b>	H01-1	Acelga	<i>S. maltophilia</i>	
	H06-1	Tierra	<i>S. maltophilia</i>	
	H07-1	Espinaca	<i>Pantoea spp</i>	
	H09-2	Lechuga	<i>S. maltophilia</i>	

---

H10-1	Espinaca	<i>S. maltophilia</i>
H23-1	Tierra	<i>S. maltophilia</i>
H23-2	Tierra	<i>S. maltophilia</i>

---

CC: Chromocult Coliformes; TSI: Triple Sugar Iron; ESBL:  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro; SC: Supercarba

**TABLA B3.** Resultados de la prueba ESBL en las cepas aisladas (Rosa: resistente; Azul: intermedio; Amarillo: sensible)

Cepa	Origen	CTX	CTL	CAZ	CAL	FEP	FEL	CTL-CTX	CAL-CAZ	FEL-FEP	Resultado
H01-1	Acelga	RI	19	24	28	14	21		4	7	+ R
H01-2	Acelga	17	17	16	14	17	16	0	-2	-1	-
H01-3	Acelga	RI	6	6	6	11	6		0	-5	-
H02-1	Col Blanca	RI	16	26	28	12	17		2	5	+R
H03-1	Espinaca	36	40	29	36	40	35	4	7	-5	+
H03-2	Espinaca	28	30	26	29	36	31	2	3	-5	-
H04-1	Zanahoria	17	20	19	19	23	21	3	0	-2	-
H06-1	Tierra	RI	11	6	12	12	11		6	-1	+R
H06-2	Tierra	RI	11	6	10	11	12		4	1	-
H07-1	Espinaca	34	36	29	32	35	31	2	3	-4	-
H07-2	Espinaca	27	28	25	27	29	28	1	2	-1	-
H08-1	Acelga	RI	13	14	14	12	18		0	6	+R
H09-1	Lechuga	RI	13	6	9	18	17		3	-1	-

<b>H09-2</b>	Lechuga	RI	21	28	30	16	19		2	3	-
<b>H10-1</b>	Espinaca	RI	6	6	6	7	8		0	1	-
<b>H11-1</b>	Lechuga	44	44	32	36	34	32	0	4	-2	-
<b>H12-1</b>	Acelga	36	40	26	36	38	34	4	10	-4	+
<b>H12-2</b>	Acelga	36	36	24	24	36	30	0	0	-6	-
<b>H15-1</b>	Espinaca	28	33	24	29	31	30	5	5	-1	+
<b>H16-1</b>	Lechuga	46	48	22	38	40	32	2	16	-8	+
<b>H18-1</b>	Zanahoria	RI	18	17	20	9	6		3	-3	-
<b>H20-1</b>	Zanahoria	32	38	23	32	36	34	6	9	-2	+
<b>H20-2</b>	Zanahoria	32	26	24	29	33	32	-6	5	-1	+
<b>H23-1</b>	Tierra	RI	19	8	17	18	20		9	2	+ R
<b>H23-2</b>	Tierra	RI	17	6	12	18	17		6	-1	+ R

**TABLA B4.** Incidencia de genes de resistencia en las cepas

Comercio	Muestra	Cepa	Identificación	Genes de resistencia										
				<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IPM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	
A	Acelga	H01-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	Acelga	H01-2	<i>C. amalonaticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A	Acelga	H01-3	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	Col blanca	H02-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	Espinaca	H03-1	<i>C. amalonaticus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A	Espinaca	H03-2	<i>E. cloacae</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
A	Zanahorias	H04-1	<i>A. baumannii</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A	Tierra	H06-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	Tierra	H06-2	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	Espinaca	H07-1	<i>Pantoea</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B	Espinaca	H07-2	<i>E. hormaechei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B	Acelga	H08-1	<i>S. maltophilia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	Lechuga	H09-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	Lechuga	H09-2	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	Espinaca	H10-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	Lechuga	H11-1	<i>P. rettgeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	Acelga	H12-1	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C	Acelga	H12-2	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B	Espinaca	H15-1	<i>C. koseri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B	Lechuga	H16-1	<i>P. rettgeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B	Zanahorias	H18-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



<b>A</b>	Zanahorias	H20-1	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<b>A</b>	Zanahorias	H20-2	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<b>A</b>	Tierra	H23-1	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A</b>	Tierra	H23-2	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total (%)</b>				2(8)	1(4)	3(12)	1(4)	4(16)	0	2(8)	4(16)	5(20)	2(8)

**TABLA B5.** Análisis estadístico de la presencia de ARGs en las cepas.

Factor		Genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos y quinolonas									
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IPM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
<b>Género</b>	$\chi^2$	3,487	25,000	10,795	11,979	25,00	-	18,207	10,119	21,875	11,413
	<i>p</i>	0,7457	0,0003	0,0949	0,0624	0,0003		0,0057	0,1197	0,0013	0,0764
<b>Muestra<sup>1</sup></b>	$\chi^2$	1,023	0,490	9,774	0,490	2,241	-	1,023	6,909	5,392	15,942
	<i>p</i>	0,9063	0,974	0,0444	0,9744	0,6915	-	0,9063	0,1408	0,2494	0,0031
<b>Comercio</b>	$\chi^2$	1,013	1,400	4,667	1,400	2,265	-	2,947	2,265	6,300	2,947
	<i>p</i>	0,7981	0,7055	0,1979	0,7055	0,5193	-	0,3993	0,5193	0,0979	0,3998

<sup>1</sup>: las muestras se agrupan en vegetales de hoja verde, col blanca, tubérculos y tierra

**TABLA B6.** Incidencia de genes de resistencia en los caldos.

Muestra	Genes de resistencia									
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IPM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXa</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
H01	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
H02	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
H03	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H04	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
H05	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H07	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
H08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

<b>H18</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>H19</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>H20</b>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>H21</b>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>H22</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>H23</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total (%)</b>	2(8)	0	8(32)	0	8(32)	1(4)	1(4)	1(4)	4(16)	0

**TABLA B7.** Análisis estadístico de la presencia de ARGs en los caldos.

<b>Factor</b>	<b>Genes de resistencia a <math>\beta</math>-lactámicos y quinolonas</b>										
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IPM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	
<b>Muestra<sup>1</sup></b>	$\chi^2$	2,103	-	1,793	-	5,467	2,962	2,962	1,140	5,282	-
	<b>p</b>	0,5512	-	0,6164	-	0,1406	0,3975	0,3975	0,7673	0,1523	-
<b>Comercio</b>	$\chi^2$	4,107	-	2,361	-	5,166	1,960	1,140	1,960	10,582	-
	<b>p</b>	0,2501	-	0,5009	-	0,1600	0,5807	0,7673	0,5807	0,0142	-

## ANEXO C

**TABLA C1.** Grado de relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenible</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>				×
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>		×		
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>	×			
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>			×	
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>			×	
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>			×	
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				×
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>				×
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>				×
ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>				×
ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				×
ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>	×			
ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>		×		
ODS 14. <b>Vida submarina.</b>				×
ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>		×		
ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				×
ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				×